

repository.ub.ac.id

**TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum*
Bory) PADA PENURUNAN KERUSAKAN SENDI TERHADAP
EKSPRESI *Interleukin-1 Beta (IL-1 β)* DAN HISTOPATOLOGI
SENDI TIKUS ARTHRITIS ADJUVAN YANG
TERPAPAR STRESSOR DINGIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
ESA VALIAN GOGIADANTA
115130100111057



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum*
Bory) PADA PENURUNAN KERUSAKAN SENDI TERHADAP
EKSPRESI *Interleukin-1 Beta*(IL-1 β) DAN HISTOPATOLOGI
SENDITIKUS ARTHRITIS ADJUVAN YANG
TERPAPAR STRESSOR DINGIN**

Oleh:

ESA VALIAN GOGIADANTA
115130100111057

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 23 April 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I



Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Pembimbing II



Dyah Kinasih W., S.Si., MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Esa Valian Gogiadanta
 NIM : 115130100111057
 Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
 Penulis Skripsi berjudul:

Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Duplicatum Bory*) Pada Penurunan Kerusakan Sendi Terhadap Ekspresi *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) Dan Histopatologi Sendi Tikus Arthritis Adjuvan Yang Terpapar Stressor Dingin

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 April 2018
 Yang menyatakan,



Esa Valian Gogiadanta
 NIM. 115130100111057

Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) pada
Penurunan Kerusakan Sendi terhadap Ekspresi *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β)
dan Histopatologi Sendi Tikus Arthritis Adjuvan
yang Terpapar Stressor Dingin

Abstrak

Arthritis Reumatoid (AR) merupakan penyakit autoimun yang bersifat inflamasi kronik sistemik pada sendi. Rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) memiliki kandungan antioksidan dan antiinflamasi yang dapat digunakan untuk terapi AR. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak rumput laut coklat terhadap ekspresi IL-1 β dan histopatologi jaringan sendi tikus (*Rattus norvegicus*) AR yang terpapar stresor dingin. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok hewan coba yaitu: kelompok kontrol negatif (P1), kelompok arthritis (P2), kelompok arthritis yang terpapar stresor dingin (P3), serta kelompok arthritis yang terpapar stresor dingin dan diberi terapi ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kg (P4). Pembuatan tikus model AR dilakukan dengan cara injeksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara intradermal. Pemberian ekstrak rumput laut coklat diberikan secara per oral melalui sonde lambung. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa setiap kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Perlakuan *stressor* dingin meningkatkan keparahan dengan meningkatkan ekspresi IL-1 β sebesar 152,61% dibanding ekspresi tikus RA sebesar 121,9%. Pemberian ekstrak ethanol rumput laut coklat menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 β sebesar 32,98% pada tikus yang AR dan terpapar *stressor* dingin. Terdapat perbaikan gambaran histopatologi sendi tarso-metatarsal yang terlihat adanya perbaikan susunan sel kondrosit pada tikus yang diterapi *Sargassum duplicatum* Bory. Dengan demikian ekstrak ethanol rumput laut coklat berpotensi sebagai alternatif pengobatan AR.

Kata kunci: Rumput Laut, AR, IL-1 β , Histopatologi

Therapy of Brown Seaweed Extract (*Sargassum duplicatum Bory*) to Improve the Expression of *Interleukin- β 1* (IL- β 1) and Joints Histopathology in Animal Model of Adjuvant Arthritis with Cold Stressor Exposure

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease which showed chronic systemic inflammation in the joint. Brown seaweed (*Sargassum duplicatum Bory*) contains antioxidants and anti-inflammatory that can used to treat RA. This study aimed to determine the effect of ethanolic extract of brown seaweed therapy against expression of IL-1 β using immunohistochemistry techniques and improvement of joint histopathology in rat model using Hematoxylen-eosin (HE) staining. Rats divided into four groups: control, RA, RA with cold stressor exposure (5⁰ C for 5 min, 7 days), and RA with cold stressor exposure treated with ethanolic extract of brown seaweed (400mg/kg BW) for 14 days. Statistical analysis showed that each treatment group were significantly different (p<0.05). The cold stressor treatment increased of RA showed by increasing of IL-1 β expression to be 152.61% while the RA group was 121.9%. The ethanolic extract of brown seaweed (*Sargassum duplicatum Bory*) therapy showed improvement of IL-1 β expression to be 32.98% in RA rat with cold stressor exposure. Joint histopathology showed an improvement of chondrocytes composition in tarso-metatarsal joint. Thus the ethanolic extract of brown seaweed had potentially to be used as an alternative treatment of RA.

Keywords: Interleukin, arthritis, *Sargassum duplicatum Bory*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul: **Terapi Rumput Laut Coklat (*Sargassum Duplicatum Bory*) pada Penurunan Kerusakan Sendi terhadap Ekspresi *Interleukin-1 beta (IL-1 β)* Gambaran Histopatologi Sendi Tikus Arthritis Adjuvan yang Terpapar Stressor Dingin.** Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Penelitian ini adalah penelitian payung yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES dan ibu Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP, M.Sc selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. Drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet dan Drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan dan masukan dengan kesabaran selama ujian Skripsi.
3. Prof.Dr.Aulanni'am,drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Jajaran Pimpinan serta Dosen dan Karyawan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Orangtua tercinta Suprpto dan Sri Restani serta Adik yang teristimewa dalam dukungan, semangat, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
5. Seluruh teman di 2011 C, teman-teman kelompok *Sargassumer* dan Mbak Vivi Shofia yang senantiasa atas saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan dan semua hal yang sangat luar biasa.
6. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan Skripsi ini yang tidak sempat disebutkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Hasil Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 28 Maret 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Arthritis Rematoid	6
2.2 Histopatologi Arthritis Rematoid.....	8
2.3 Arthritis ajuvan sebagai model untuk Arthritis Rematoid	11
2.4 Hewan Model Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Arthritis.....	12
2.5 Interleukin 1 beta (IL-1 β).....	14
2.6 Stresor Dingin	15
2.7 Rumput Laut Coklat (<i>Sargassum duplicatum</i> Bory).....	17
2.7.1 Habitat dan perkembangbiakan	18
2.7.2 Manfaat dan kandungan Sargassum sp	19
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konseptual.....	21
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4. METODE PENELITIAN	24
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
4.2 Bahan Penelitian	24
4.2.1 Hewan Coba.....	24
4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	24
4.3 Tahapan Penelitian.....	26
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	26
4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian.....	26
4.3.3 Rancangan Penelitian.....	27
4.3.4 Variabel Penelitian.....	28
4.4 Prosedur Kerja	28
4.4.1 Persiapan Hewan Model	28
4.4.2 prosedur Induksi Arthritis Menggunakan (CFA).....	29
4.4.3 Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat.....	30

4.4.4 Dosis Ekstrak Rumput Laut Coklat	30
4.4.5 Pengukuran Ekspresi <i>Interleukin-1β</i>	31
4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	32
4.5 Analisis Data.....	34
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Ekspresi <i>Interleukin-1β</i>	35
5.2 Terapi Ekstrak Ethanol Rumput Laut Coklat.....	40
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	50



DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Tabel Kelompok Penelitian.....	26
5.1 Persentase Area Hasil Analisis ImmunoRatio	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Histopalogi sendi normal tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	6
2.2 Tulang rawan hialin tikus.....	7
2.3 Patogenesis AR	9
2.4 Histopatologi AR tikus.....	10
2.5 <i>Rattus Norvegicus</i>	13
2.6 Sendi pada kaki tikus	13
2.7 Rumput laut coklat	18
3.1 Kerangka Konsepula Penelitian	21
5.1 Immunohistokimia Kartilago pada Bagian Tarsometatarsal.....	36
5.2 Reaksi <i>Scavenging</i>	37
5.3 Histopatologi Jaringan Sendi Tarsometatarsal	41
5.4 Histopatologi Kartilago pada Bagian Tarsometatarsal	43



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	51
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	52
3. Perhitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Etanol Rumput Laut Coklat	53
4. Pembuatan Preparat Jaringan	54
5. Skema Prosedur Pengamatan Ekspresi IL-1 β	55
6. Pembuatan Ekstrak Etanol Rumput Laut Coklat.....	57
7. SPSS (<i>Statistical Package for Social Sciences</i>)	58
8. Perhitungan <i>Immunoratio</i>	61



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

AIA	: <i>Adjuvan-Induced Arthritis</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
ATP	: <i>Adenosin Tri Posfat</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	: <i>Ciklik Adenosin Monofosfat</i>
CD4	: <i>Cluster Differentiation 4</i>
CFA	: <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DAB	: <i>3,3 diaminobenzidine tetraterahydrochloride</i>
DNA	: <i>Deoxyribose-nucleic acid</i>
FC	: <i>Fragment Crystalizable</i>
GSH-PX	: <i>Gluthation peroxidase</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen Peroxide</i>
He	: <i>Hematoksin eosin</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin-G</i>
IgM	: <i>Imunoglobulin-M</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1 beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
MMP-2	: <i>Metaloproteinase-2</i>
MMP-3	: <i>Metaloproteinase-3</i>
MMP-9	: <i>Metaloproteinase-9</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor-kappa Beta</i>
O ₂ ^{-*}	: <i>Superoksida</i>
OH	: <i>Hidroksil</i>
OHO	: <i>Hydroxyl Radicals</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Peraformaldehida</i>
RA	: <i>Rheumatoid Arthritis</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of NF-kB Ligand</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin-Horseradish Peroxide</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UPC-1	: <i>Uncoupling Protein-1</i>
UPHP	: <i>Unit Pengembangan Hewan Percobaan</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pet animal atau hewan kesayangan beberapa tahun ini telah menjadi hewan peliharaan yang *trend* bagi masyarakat Indonesia. Dalam memelihara hewan kesayangan tentunya tidak luput dari perawatan sampai pengobatan terhadap penyakit yang sering diderita, baik infeksius maupun non infeksius.

Arthritis Reumatoid (AR) adalah penyakit autoimun yang dapat menyebabkan inflamasi kronik-sistemik. Inflamasi kronik ini menimbulkan terjadinya hipertrofi dan penebalan pada membran sinovium, aliran darah terhambat dan nekrosis sel. Penebalan sinovium oleh lapisan jaringan granular membentuk panus yang bersifat destruktif dan menyebabkan inflamasi berlanjut, membentuk jaringan parut yang dapat memacu kerusakan sendi menyebabkan degradasi jaringan ikat terutama pada organ sinovium dan struktur sendi seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, ligamen dan tendon yang pada akhirnya menyebabkan deformitas sehingga terjadi kekakuan dan kehilangan fungsi sendi secara permanen. Sebanyak 0,5-1% penduduk dunia dan kurang dari 0,4% penduduk Indonesia menderita AR dan 2-3 kali lebih pada wanita (Holm *et al.*, 2001).

Peningkatan suhu global mengakibatkan terjadinya perubahan iklim yang sangat ekstrim sehingga saat cuaca dingin suhu menjadi sangat dingin, begitu juga dengan penggunaa *air conditioner* diberbagai lokasi menjadi stresor dingin pada penderita AR. Menurut Prabowo (2004) stresor dingin pada arthritis

ajuvan akan meningkatkan proses peradangan dengan terjadinya peningkatan *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) dan jaringan sendi.

Interleukin-1 beta (IL-1 β) merupakan mediator utama dalam proses inflamasi pada daerah sinovium dan dalam proses pembentukan panus. Panus adalah jaringan granulasi yang terbentuk dari makrofag serta sel-sel radang lainnya. Selanjutnya IL-1 β menginduksi terjadinya proliferasi sel-sel sinovium dan meningkatkan produksi sel sinovium sehingga dapat mengakibatkan degradasi tulang rawan pada sendi. IL-1 β ini mampu menghambat proses pemulihan tulang rawan pada sendi melalui penghambatan sintesis protein matriks (Suryana, 2008).

Sampai saat ini belum ada terapi definitif yang efektif untuk penyembuhan AR (Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2008). *Sargassum duplicatum* Bory merupakan salah satu jenis rumput laut coklat dari Indonesia yang berpotensi sebagai antioksidan (Jhamandas *et al.*, 2005) karena mengandung komponen fenolik (Lim *et al.*, 2002). Jenis komponen fenolik yang banyak dijumpai pada rumput laut coklat adalah phlorotanin yang berkisar antara 0,74% sampai 5,06% (Samee *et al.*, 2009). Pengaruh *Sargassum duplicatum* Bory dilaporkan Aulanni'am (2012) mampu meredam radikal bebas pada tikus yang menderita IBD.

Pada penelitian ini pemberian rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) digunakan untuk menghambat ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) pada sendi dan menurunkan kerusakan histopatologi jaringan sendi akibat stresor dingin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus arthritis yang terpapar stresor dingin menurunkan ekspresi IL-1 β ?
2. Apakah pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin dapat memperbaiki kerusakan histopatologi sendi?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 10-12 minggu dan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta. Penggunaan hewan model dalam penelitian sudah mendapat sertifikasi laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. (Lampiran 6)
2. Pembuatan keadaan arthritis rematoid pada hewan model tikus arthritis dilakukan dengan cara induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sebanyak 0,1 mL dibagian ekor secara intradermal pada hari ke-1 dan diinduksi CFA kembali sebanyak 0,05 ml dibagian *metacarpophalangeal extremitas caudal sinister* dan *metacarpophalangeal extremitas caudal dexter* pada hari ke-7 (Prabowo, 2005). Perlakuan ditambahkan dengan

paparan *stressor* dingin selama 15 menit dalam jangka waktu 7 hari berturut-turut.

3. Varietas rumput laut yang digunakan untuk terapi yaitu rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) yang diperoleh dari perairan laut Madura, Jawa Timur.
4. Dosis terapi yang digunakan pada ekstrak etanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) menggunakan satu dosis 400mg/kgBB selama 2 minggu.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) dengan metode imunohistokimia dan dianalisis menggunakan uji Anova serta perbaikan gambaran histopatologi jaringan sendi secara kualitatif menggunakan mikroskop.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengkaji pengaruh pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin pada ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β).
2. Mengkaji pengaruh pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin pada skala histopatologi kerusakan sendi.

1.5 Manfaat Penelitian

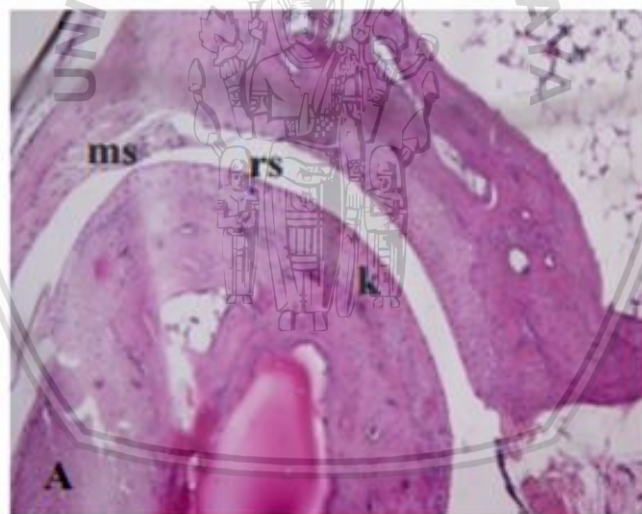
1. Mengetahui peran *Sargassum duplicatum* Bory pada penurunan kerusakan sendi melalui penghambatan aktivasi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) pada hewan coba artritis ajuvan terpapar stresor dingin.
2. Mengetahui peran *Sargassum duplicatum* Bory pada penurunan kerusakan sendi pada skala histopatologi kerusakan sendi pada hewan coba artritis ajuvan terpapar stresor dingin.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Histologi Sendi

Sendi adalah pertemuan antara dua tulang atau lebih. Sendi memberikan adanya segmentasi pada rangka manusia dan memberikan kemungkinan variasi pergerakan diantara segmen-segmen (Brunner & Sudarth, 2002). Pada Gambar 2.2 terlihat bentuk normal membran sinovial dimana membran sinovial normal merupakan lapisan tipis sel-sel sinovial yang mendasari jaringan ikat longgar, bentuk kartilago yang normal dengan matriks yang teratur dan rongga sendi yang simetris (Setiawan, 2013).



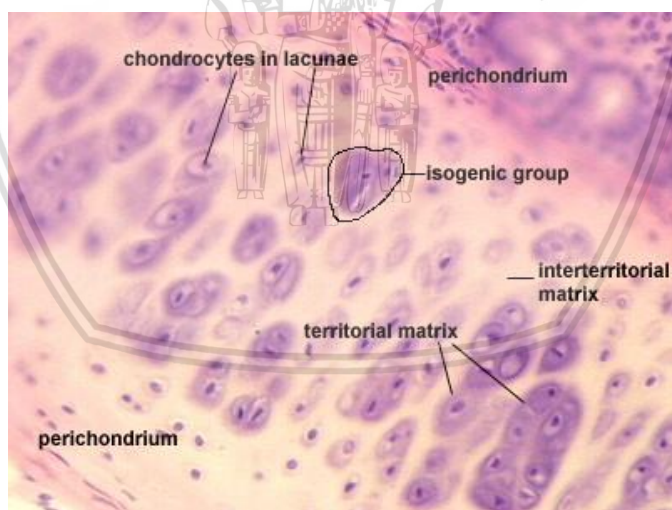
Gambar 2.1 Histopalogi sendi normal tikus (*Rattus norvegicus*) (Setiawan, 2013).

Keterangan : Pewarnaan Hematosiklin Eosin perbesaran 100x, kartilago (k), membran sinovial (ms), rongga sendi (rs).

Sinovium dalam sendi normal merupakan lapisan tipis halus yang memegang beberapa fungsi penting, yaitu sebagai sumber nutrisi penting untuk tulang rawan. Sel-sel sinovial juga berperan dalam mensintesis pelumas sendi seperti asam

hyaluronic dan fibronectin serta kolagen yang merupakan kerangka struktural dari interstitium sinovial.

Tulang rawan terdiri dari kolagen tipe II dan proteoglikan yang merupakan jaringan yang terkena dampak cukup besar pada kasus AR akibat dari stres oksidatif. Kasus AR ini akan memberikan gambaran integritas, ketahanan dan hidrofobik sel yang terganggu. Hal ini dikarenakan pengaruh enzim proteolitik (kolagenase, stromelysin) baik oleh sel-sel lapisan sinovial maupun sel-sel kondrosit. Sitokin meningkatkan reaksi oksigen reaktif spesies, nitrogen dan sekaligus meningkatkan jalur katabolik kondrosit, juga menghambat pembentukan tulang rawan baru. Leukosit polimorfonuklear dalam cairan sinovial juga dapat menyebabkan proses degradatif (Clifton, 2007).



Gambar 2.2 Tulang rawan hialin tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 400x (Gary, 2003).

Tulang rawan hialin pada Gambar 2.3 adalah jenis tulang rawan yang paling luas dan, pada orang dewasa, membentuk permukaan artikular tulang panjang,

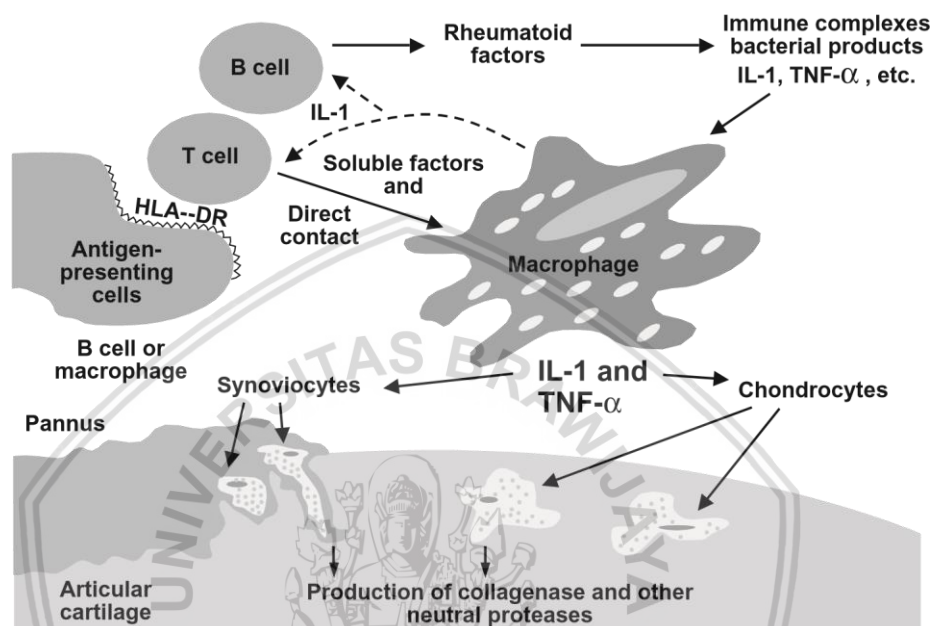
tulang rusuk tips, cincin trakea, dan bagian tengkorak. Jenis tulang rawan didominasi kolagen (namun dengan beberapa serat kolagen), dan namanya mengacu pada penampilan kacanya. Tulang rawan hialin menunjukkan kondrosit dan organel, kekosongan dan matriks. Tulang rawan hialin ditutupi eksternal oleh membran fibrosa, yang disebut perichondrium. Membran ini mengandung pembuluh yang menyediakan tulang rawan dengan gizi (Clifton, 2007).

2.2 Arthritis Reumatoid

Arthritis Reumatoid (AR) merupakan penyakit peradangan kronik mengakibatkan terjadinya degenerasi jaringan ikat, peradangan (inflamasi) yang terjadi secara terus-menerus, organ yang paling sering diserang adalah sinovium dan menyebar ke struktur sendi di sekitarnya seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, ligamen, dan tendon. Terjadinya inflamasi dapat ditandai dengan adanya penimbunan sel darah putih, pengaktifan komplemen, fagositosis ekstensif dan pembentukan jaringan granula (Katryn, 2006).

Inflamasi pada AR terjadi secara terus-menerus terutama pada organ sinovium dan menyebar ke struktur sendi di sekitarnya seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, ligamen dan tendon. Tanda-tanda inflamasi yaitu munculnya penimbunan sel darah putih, pengaktifan komplemen, fagositosis ekstensif dan pembentukan jaringan granular. Sedangkan inflamasi kronik dapat menyebabkan hipertropi dan penebalan pada membran sinovium, terjadi hambatan aliran darah, dan nekrosis sel. Panus juga akan terbentuk karena penebalan sinovium yang dilapisi jaringan granular. Panus akan menyebar ke sinovium dan menyebabkan peradangan dan

pembentukan jaringan parut yang memacu kerusakan sendi dan deformitas (Wiralis, 2008).

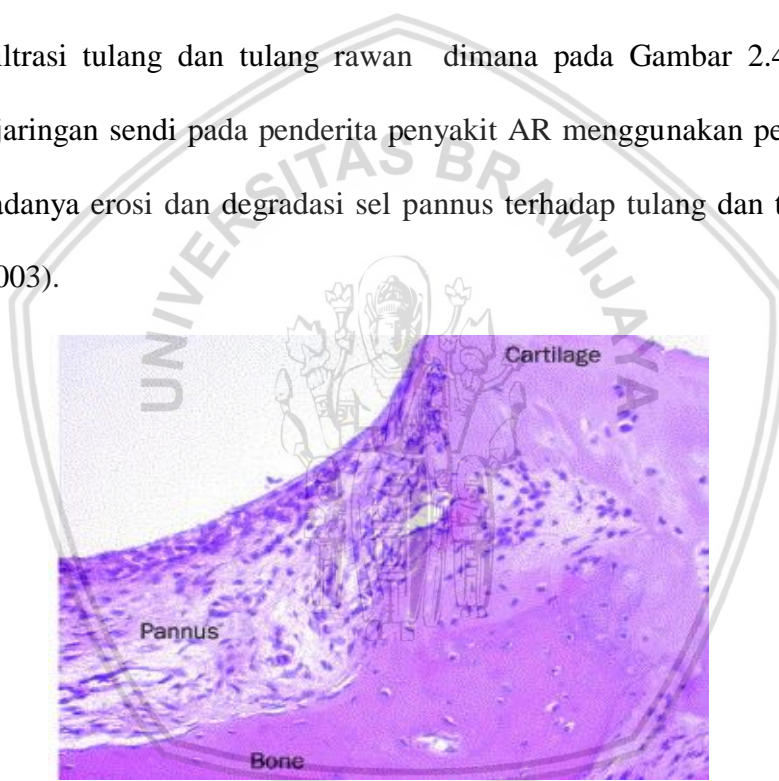


Gambar 2.3 : Patogenesis AR sumber: Nasution & Sumaryono (2006).

Arthritis reumatoid (AR) timbul setelah aktivasi antigen yang memunculkan respon imun. Antigen dapat berupa bakteri, mikoplasma dan virus. Pada gambar 2.1 menggambarkan bahwa antigen memacu perubahan respons imun non-spesifik dan spesifik berbagai tipe sel termasuk sel T, makrofag, *antigen precenting cell* (APC) dan sel endotel, menyebabkan inflamasi (Husney, 2004). Inflamasi menyebabkan pelepasan berbagai protein sitokin. Sitokin memiliki fungsi antara lain memelihara keseimbangan tubuh selama terjadi respon imun, infeksi, kerusakan, perbaikan jaringan, membersihkan jaringan mati, darah yang membeku dan proses penyembuhan. Produksi sitokin meningkat, kelebihan sitokin dapat menyebabkan kerusakan yang serius pada sendi saat inflamasi AR. Sitokin yang

berperan penting pada AR antara lain adalah IL-1, IL-6, TNF- α dan NO. Nitrit oksida diketahui dapat menyebabkan kerusakan sendi dan berbagai manifestasi sistemik (Rahmad dkk, 2006).

Pada kasus AR terjadi hipertropi dari sinovium menyerang dan mengikis tulang rawan dan tulang yang berdekatan (pannus) (Kanaugh & Lipsky, 1998). Pada artritis reumatoid cairan sinovial sangat bersifat inflamasi, selain itu sel pannus menginfiltrasi tulang dan tulang rawan dimana pada Gambar 2.4 merupakan gambar jaringan sendi pada penderita penyakit AR menggunakan pewarnaan HE terlihat adanya erosi dan degradasi sel pannus terhadap tulang dan tulang rawan (Gary, 2003).



Gambar 2.4 Histopatologi AR tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan pewarnaan HE pada perbesaran 100x (Gary, 2003).

2.3 Arthritis ajuvan sebagai model untuk Arthritis Rematoid

Tikus merupakan salah satu hewan model untuk arthritis reumatoid (Crofford and Ronald, 2000). Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain wistar (Armitage, 2004). Arthritis ajuvan atau *Adjuvant Induced Arthritis* (AIA) merupakan salah satu model hewan coba standar yang digunakan untuk menjelaskan patomekanisme arthritis rematoid (Aulanni'am dan Ulhaq, 2011).

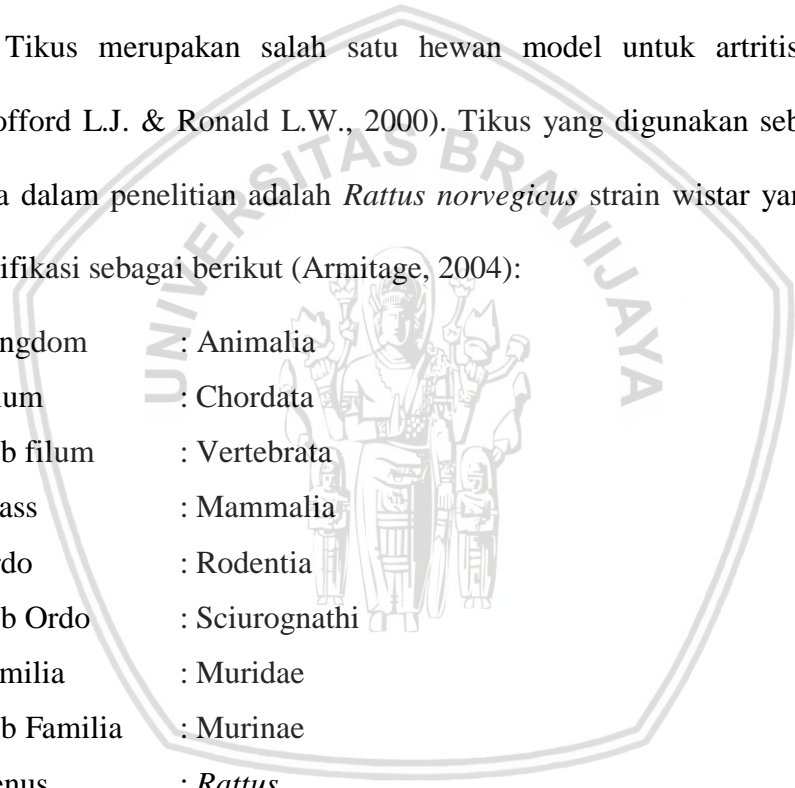
Preparasi *arthritis adjuvant* pada *Rattus norvegicus* melalui *complete freund's adjuvant* (CFA) secara intradermal. CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) merupakan suatu emulsi minyak yang mengandung *Mycobacterium butyricum* yang digunakan untuk meningkatkan imunitas. Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menyebabkan respons inflamasi. Manifestasi klinik dan karakteristik gambaran histopatologi analog dengan AR pada manusia. Untuk itu imunisasi CFA diterima secara luas sebagai model eksperimen pada hewan coba (Holm, 2001 ; Fletcher, 2007 ; Prabowo, 2005 ; dalam Wiralis dan Endang, 2009). CFA dalam emulsi minyak yang mengandung *Heat killed-Mycobacterium butyricum* akan meningkatkan imunitas dan merangsang respon imun yang lebih besar daripada antigen sendirian.

Penggunaan CFA lebih dari satu kali injeksi menyebabkan respon inflamasi dan nekrosis pada hewan coba. Pertama kali diinjeksikan pada bagian ekor selanjutnya bagian sendi kaki (Nagakura *et al.*, 2003; Subramanian, 2009). Inflamasi kronik terjadi setelah hari ke 10-14 pasca imunisasi, dalam penelitian ini didapatkan hasil tikus yang mengalami peradangan sendi pada

semua sampel akibat dari perlakuan injeksi CFA tersebut dengan terlihat adanya kebengkakan pada sendi dan secara histopatologi terlihat adanya infiltrasi sel-sel inflamasi pada jaringan sendi (Prabowo, 2005; Fletcher *et al.*, 2007).

2.4 Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Arthritis

Tikus merupakan salah satu hewan model untuk arthritis reumatoid (Crofford L.J. & Ronald L.W., 2000). Tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004):



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Klass	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Sciurognathi
Familia	: Muridae
Sub Familia	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar



Gambar 2.5 *Rattus Norvegicus* (Ronaghy *et al.*, 2002)

Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang merupakan suatu emulsi minyak yang mengandung *Mycobacterium butyricum* yang digunakan untuk meningkatkan imunitas. Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menyebabkan respons inflamasi. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dapat merangsang respon imun yang lebih besar dari pada antigen yang sendirian atau bahan kimia yang dapat merusak sel maupun jaringan sehingga dapat terjadi inflamasi. Manifestasi klinik dan karakteristik gambaran histopatologik analog dengan AR pada manusia. Untuk itu imunisasi CFA diterima secara luas sebagai model eksperimen pada hewan coba (Holm, 2001 ; Fletcher, 2007 ; Prabowo, 2005 ; Wiralis & Endang, 2009).



Gambar 2.6 Sendi pada kaki tikus (*Rattus norvegicus*) (Bendele, 2001)

2.5 *Interleukin-1 beta* (IL-1 β)

Interleukin-1 merupakan mediator inflamasi yang erupakan respon terhadap infeksi (Barawijaya, 2004). *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit T, yang melepaskan signal inflamasi. Sitokin ini menstimulir sel monosit melakukan adhesi ke endotel. Setelah melewati permukaan endotel, sel inflamasi tersebut kemudian bermigrasi ke sub endothel sehingga menyebabkan kerusakan endotel (Elzirik & Mandrup, 2001). IL-1 β menyebabkan infiltrasi leukosit sehingga menyebabkan hiperplasia membran sinovial dan kerusakan kartilago (Dinareello, 1996).

Interleukin-1 beta (IL-1 β) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) adalah sitokin utama yang sering terlibat dalam kerusakan sendi dan merupakan stimulator yang kuat sel-sel pada sinovium, kondrosit dan ostoklast. Sitokin ini menghambat produksi proteoglikan, kolagen tipe II, dan merangsang kondrosit dan sel-sel pada sinovium melepaskan protease yang merusak seperti matriks metalloproteinase (MMPs), Cystein proteinase dan lain-lain yang mempunyai kemampuan hidrolisis komponen-komponen matrix ekstraseluler terutama proteoglikan dan kolagen (Isbagio, 2006).

Interleukin-1 beta adalah mediator utama pada inflamasi sinovium dan pembentukan panus. Panus merupakan jaringan granulasi yang terbentuk dari makrofag dan sel – sel radang lainnya. Faktor pertumbuhan Fibroblast Growth Factor (FGF) yang menyebabkan proliferasi fibroblast serta faktor angiogenesis Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) yang akan

membentuk pembuluh darah baru (Yuliasih, 2009). IL-1 β menginduksi proliferasi sel – sel sinovium dan meningkatkan produksi MMP oleh konrosit dan sel sinovium sehingga mengakibatkan degradasi tulang rawan sendi. Sitokin ini juga menghambat proses pemulihan tulang rawan sendi melalui penghambatan sintesis protein matriks (Suryana, 2008).

2.6 Stresor Dingin

Stimulus atau peristiwa yang menimbulkan respon stres pada organisme disebut stresor. Tubuh secara fisiologis akan berusaha meregulasi untuk mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan dengan mentransfer energi dari makanan menjadi panas yang disebut termogenesis ketika dipapar stresor dingin (Guyton and Hall, 2011). Stres berhubungan dengan onset dan pengalaman penderita terhadap keadaan kesakitan. Setiap individu ketika terpapar stresor akan berusaha beradaptasi sampai menuju keadaan homeostatis. Proses adaptasi tersebut apabila gagal maka terjadi perubahan neurofisiologi dan neurokimia yang kompleks (Zaura et al., 2007).

Sistem metabolisme dan sistem imunologi dari setiap individu berbeda karena dapat dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Pusat pengatur panas dalam tubuh adalah hipotalamus. Hipotalamus ini dikenal sebagai thermostat yang berada dibawah otak. Prabowo (2004) menjelaskan bahwa stresor dingin akan meningkatkan proses peradangan dengan adanya peningkatan IL-1, IL-2 dan Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α) pada plasma dan jaringan sendi. Stresor dingin menyebabkan tubuh meningkatkan produksi panas sehingga suhu tubuh

dapat dipertahankan. Pada paparan stresor dingin secara fisiologis otak mengendalikan tubuh untuk melakukan termogenesis. Termogenesis adalah upaya mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan dengan cara mentransfer energi dari makanan menjadi panas. Stresor dingin yang terdeteksi oleh otak menyebabkan aktivasi jaras eferen. Komponen efektor utama respon ini adalah sistem saraf simpatik yang banyak menginervasi target termogenik seperti jaringan lemak coklat dan otot bergaris. Aktivasi sistem saraf simpatik akan meningkatkan aktivitas uncoupling proteins (UCP) yang memicu termogenesis meningkat. Paparan stresor dingin yang diberikan pada tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan dapat meningkatkan siklus fosforilasi oksidatif.

Menurut Mitchell and Moyle (1967), fosforilasi oksidatif adalah suatu lintasan metabolisme yang menggunakan energi yang dilepaskan oleh oksidasi nutrien untuk menghasilkan adenosina trifosfat (ATP). Selama fosforilasi oksidatif, elektron ditransfer dari pendonor elektron ke penerima elektron melalui reaksi redoks. Reaksi redoks ini melepaskan energi yang digunakan untuk membentuk ATP. Pada eukariota, reaksi redoks ini dijalankan oleh serangkaian kompleks protein di dalam mitokondria, sedangkan pada prokariota dimana protein-protein ini berada di membran dalam sel. Enzim-enzim yang saling berhubungan ini disebut sebagai rantai transpor elektron. Walaupun fosforilasi oksidatif adalah bagian vital dari metabolisme, fosforilasi oksidatif juga menghasilkan ROS seperti superoksida dan hidrogen peroksida. Hal tersebut dapat mengakibatkan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas

apabila diproduksi berlebihan dapat merusak sel tubuh dan menyebabkan kerusakan oksidatif.

2.7 Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory)

Sargassum duplicatum Bory memiliki diameter thallus pada batang utama yang membulat dan agak gepeng pada cabangnya, permukaan halus atau licin. Percabangan dichotomous dengan bentuk daun bulat lonjong, pinggirannya bergerigi dan tebal. Gelembung udara melekat pada batang daun, berbentuk bulat telur, ada yang bersayar dan menyerupai bentuk daun. Organ reproduksi membentuk rangkaian yang rimbun merapat seperti kembang kol berwarna cokelat tua atau cokelat muda. Tinggi rumpun dari *Sargassum duplicatum* Bory dapat mencapai 60 cm. rumput laut ini mempunyai pigmen fotosintetis karotin, fukosantin, klorofil A dan C sehingga tumbuhan berwarna pirang atau cokelat. Produk fotosintetiknya adalah polisakarida berupa laminaran, manitol dan alginat. Perkembangbiakan dilakukan dengan cara seksual dan aseksual. Klasifikasi *Sargassum* sp. (Anggadiredja *et al.*, 2006) adalah sebagai berikut :

Divisio	:	Thallophyta
Kelas	:	Phaeophyceae
Bangsa	:	Fucales
Suku	:	Sargassaceae
Marga	:	<i>Sargassum</i>
Jenis	:	<i>Sargassum</i> sp.



Gambar 2.7 Rumput laut coklat (Anggadireja *et al.*, 2006).

2.7.1 Habitat dan perkembangbiakan

Sargassum merupakan ganggang besar yang tumbuh disepanjang tahun, tumbuhan ini ada di setiap musim barat maupun timur, dijumpai diberbagai perairan. Umumnya ditemukan di pantai Indonesia, Malaysia, Singapura, Vietnam dan Filipina. Beberapa spesies berasal dari Burma, Thailand dan Papua Nugini. Pedalaman untuk pertumbuhannya dari 0,5-10 meter. Marga Sargassum termasuk dalam kelas Phaeophyceae tumbuh subur pada daerah tropis, suhu perairan 27,25-29,3° C dan salinasi 32-33,5%. Kebutuhan cahaya matahari lebih tinggi dibandingkan marga alga merah.

Habitat Sargassum (rumput laut coklat) ini di Indonesia banyak ditemukan menempel pada batu di daerah rata-an ombak. Persebarannya di sekitar pantai selatan Jawa dan Maluku. Secara potensi ekonomi, jenis *Sargassum sp.* ini masih belum banyak dimanfaatkan dan dibudidayakan karena rumput laut ini mempunyai flagella pada sistem reproduksi yang

bersifat melekat pada substrat dan tidak berkembang secara vegetatif (Surono, 2009).

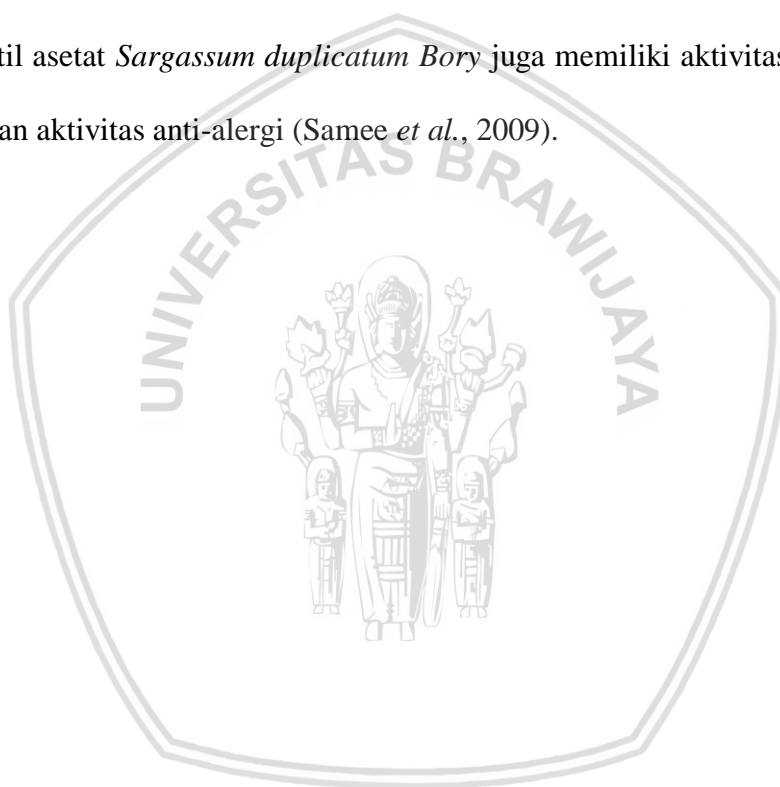
Perkembangbiakan atau reproduksi marga *Sargassum* yang termasuk bangsa Fucales, Keluarga *Sargassaceae* dikenal dua cara yaitu reproduksi aseksual (vegetatif) dan seksual (generatif). Reproduksi vegetatif dilakukan melalui fragmentasi yaitu potongan thallus berkembang melakukan pertumbuhannya. Cara ini banyak dilakukan untuk usaha budi daya. Reproduksi generatif yaitu perkembangan individu melalui organ jantan (antheridia) dan organ betina (oogenia).

2.7.2 Manfaat dan kandungan *Sargassum* sp

Secara umum, rumput laut mempunyai kandungan nutrisi cukup lengkap. Diketahui rumput laut terdiri dari air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (6,6%) serat kasar (3%) dan abu (22,25%). Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, rumput laut juga mengandung enzim asam nukleat, asam amino vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan makro mineral seperti nitrogen, oksigen, kalsium dan selenium serta mikro mineral seperti zat besi, magnesium dan aatrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral rumput laut mencapai 10-20 kali lipat dibandingkan dengan tanaman darat. Kandungan *Sargassum* sp memiliki fucoxanthin dengan kadar yang tinggi, fucoidan dan iodin yang rendah. Pada setiap *Sargassum* sp mengandung 20,95 fucoxanthin (Fahri, 2010).

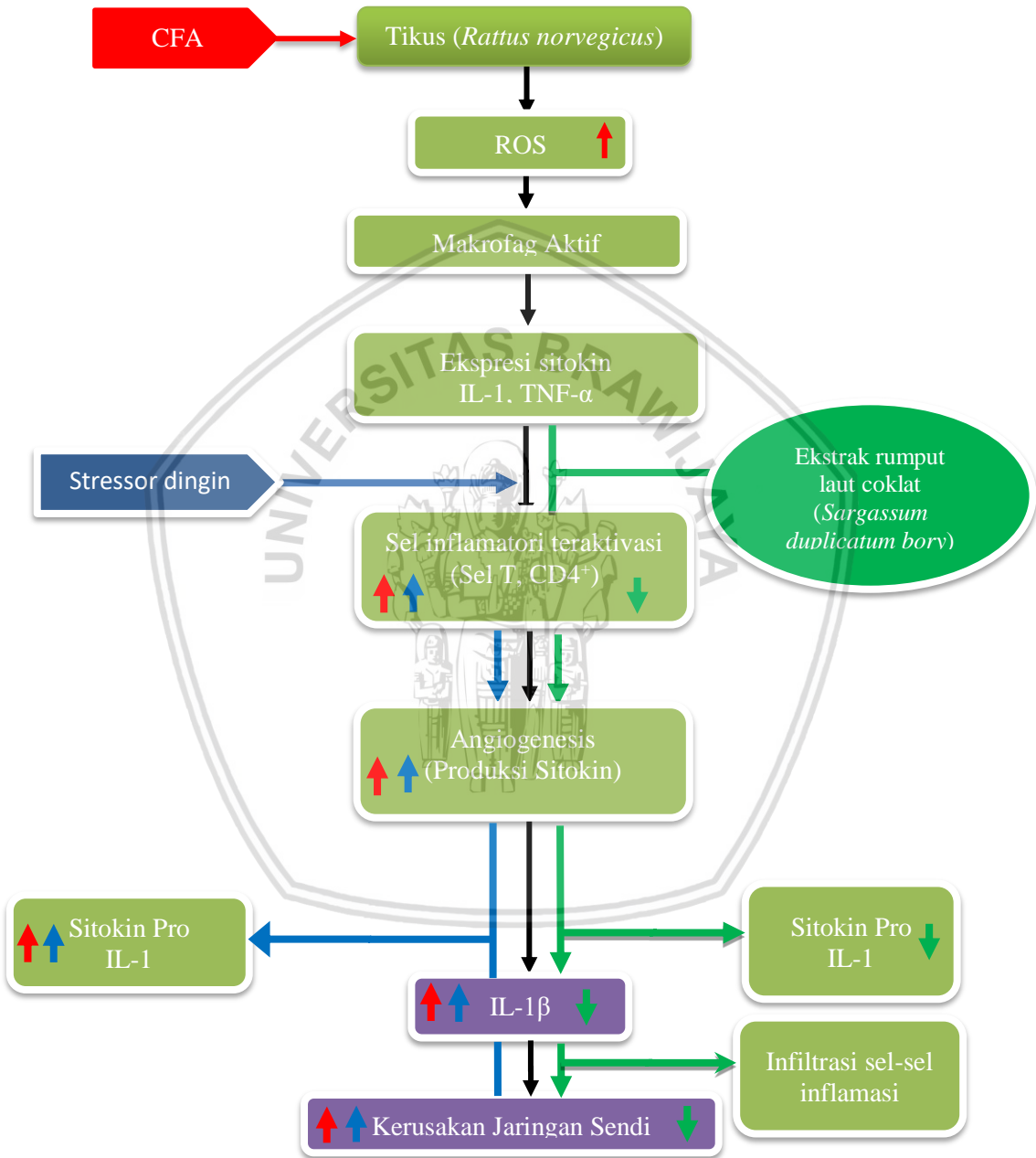
Rumput laut cokelat (*Sargassum duplicatum* Bory) merupakan alga yang memiliki kandungan berupa lemak, protein, karbohidrat, vitamin,

mineral, iodin dan alginate. Selain itu terdapat kandungan antioksidan dan polifenol (flavonod dan florotanin) dan fukosantin pada *Sargassum sp.* (Liem *et al.*, 2002), penelitian Botutihe (2010) menyatakan kandungan antioksidan polifenol (flavonoid) ekstrak etanol 85% *Sargassum duplicatum* Bory dengan dosis 100 mg/kg berat badan tikus terbukti mampu menurunkan kadar radikal bebas. Florotanin kasar hasil ekstrak etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory juga memiliki aktivitas antioksidan dan aktivitas anti-alergi (Samee *et al.*, 2009).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

Keterangan gambar:

- : Injeksi CFA
- : Terapi ekstrak Rumput Laut Coklat
- : Paparan Stressor dingin
- : Variabel yang diamati

- : Efek pemberian CFA
- : Efek Paparan stressor dingin
- : Efek terapi Rumput laut coklat
- : Menghambat
- : Menstimuli

Pemberian *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menyebabkan inflamasi dan mengaktivasi mediator inflamasi seperti sel T. Antigen yang telah diproses oleh APC selanjutnya akan dilekatkan pada CD4 (+) limfosit T dan selanjutnya akan mengaktivasi sel limfosit T. Selain sebagai penyaji antigen sel APC juga mengeluarkan sitokon-sitokin proinflamasi seperti *interleukin-1 beta* (IL-1), *interleukin 6* (IL-6), *interleukin 8* (IL-8) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang akan menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas, sinoviosit dan kondrosit yang akan menyebabkan inflamasi dan kerusakan dari sendi (Baratawidjaja & Rengganis, 2009). *Reactive Oxygen Species* (ROS) juga dihasilkan selama proses inflamasi sehingga akan menyebabkan kondisi stress oksidatif dan produksi senyawa radikal bebas seperti hidroksil (OH⁻), radikal superoksida (O₂⁻), hidrogen peroksida (H₂O₂).

Reaksi ROS akan mengakibatkan terjadinya *angiogenesis* yang ditandai dengan ekspresi molekul adhesi dan produksi sitokin yang meningkat. Ekstrak etanol rumput laut coklat memiliki kandungan antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan akan menghambat proses aktivasi sel inflamasi sehingga aktivasi makrofag dalam memproduksi sitokin juga berkurang dan terhambatnya juga produksi radikal bebas. Kandungan antiinflamasi dalam rumput laut coklat akan menghambat aktifitas IL-1 β yang mendegradasi jaringan sendi. Sehingga akan terjadi penurunan kerusakan jaringan sendi melalui penghambatan jalur siklooksigenase. Serta *stressor* dingin akan meningkatkan sistem imunologi pada tubuh hewan coba.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin menghambat ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β).
2. Pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin memperbaiki gambaran histopatologi pada sendi.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu perawatan dan perlakuan terhadap hewan model dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Pembedahan serta pemeriksaan ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Januari 2015 sampai dengan Maret 2015.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 10-12 minggu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan didalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di laboratorium biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi makan pelet standar dan minum secara *ad libitum*.

4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat-alat meliputi kandang tikus, timbangan untuk menimbang berat badan tikus, alat fiksasi, kandang jepit tikus, alat pencekok oral (sonde lambung), pot untuk fiksasi jaringan, gunting bedah, spuit 1 cc, pinset anatomis, pinset chirurgis, jarum pentul, kertas label,

microtube, *micropipete*, tabung reaksi, labu ukur (10 ml, 50 ml, 100 ml), vorteks, kertas saring, alat sentrifugasi, entellan, labu *erlenmeyer*, corong gelas, labu evaporator, labu penampung, *rotary evaporator*, *objek glass*, *cover glass*, lem entelan, cetakan dari logam berbentuk L untuk *embedding*, *Water bath*, *Staining* jaringan untuk pengecatan, mikroskop digital kamera untuk melihat hasil sediaan.

Bahan yang dipergunakan pada hewan coba adalah *Sargassum duplicattum* Bory dengan dosis 400 mg/kg BB dan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Bahan pemeriksaan adalah darah tikus, jaringan sinovial tikus, ketamin untuk pembiusan, bahan untuk pembuatan preparat histologi metode parafin antara lain larutan bouin untuk fiksasi yang dibuat dari asam pikat jenuh 1, 22 % sebanyak 750 ml, formaldehid 37-40 % sebanyak 250 ml, asam asetat glasial sebanyak 50 ml, juga diperlukan untuk dehidrasi yaitu alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 % dan absolut. Larutan untuk clearing yaitu xylol atau xylene, sedangkan untuk blok jaringan digunakan parafin cair. Albumin meyer, dibuat dari putih telur dan gliserin 1:1, canada balsam untuk mounting.

Bahan untuk pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE) adalah larutan Xylol, Alkohol 95 %, air kran, Larutan Hematoxyline, alkohol asam (acid alcohol) 1%, Larutan ammonia, Larut Eosin. Bahan untuk pewarnaan Immunohistokimia adalah larutan aseton, larutan Xylol, alkohol 100 %, 96 %, 80 %, dan 70%, PBS pH 7,4, Tripsin 3%, H₂O₂ 3%, Aquades, TRIS-PBS, Dako Kit, Larutan Hematoxyline dan Deck glass.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria inklusi hewan model adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*, jenis kelamin jantan, umur 12 minggu, berat badan antara 150-200 gram, kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), masih dalam proses mendapatkan laik etik penelitian oleh KEP FKUB.

4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati IL-B1 dan HE Sendi
P1 (Kontrol negatif)	Kelompok kontrol tikus normal	
P2 (Kontrol positif)	Kelompok tikus artritis induksi CFA	
P3 (perlakuan 1)	Perlakuan dibuat menjadi artritis dan diberi stresor dingin yaitu dimasukkan dalam ruangan 5 ⁰ C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut	
P4 (perlakuan 2)	Perlakuan dibuat menjadi artritis dan diberi stresor dingin dengan cara dimasukkan dalam ruangan 5 ⁰ C selama 15 menit selama 7 hari dan diberikan ekstrak <i>Sargassum duplicatum</i> Bory dengan dosis 400 mg/kgBB secara per oral selama 14 hari.	

Banyaknya hewan model yang diperlukan dalam penelitian dapat dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

$$\text{Sehingga : } p(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, untuk empat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal lima kali ulangan dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan lima kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 20 ekor. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol negatif (P1), kontrol positif (2), positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2.

4.3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*) dengan menggunakan metode *Post test only control group design*, yaitu kegiatan percobaan (eksperimen) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Dalam penelitian ini digunakan tikus putih jenis Wistar sebagai hewan coba, yang dibuat menjadi arthritis (selanjutnya disebut arthritis ajuvan) dengan cara melakukan injeksi secara intradermal pada pangkal ekor tikus 0,1 ml *Coplete Freund's Adjuvant* (CFA), dan diberikan booster 14 hari kemudian secara intradermal pada kaki

kanan kiri. Perubahan klinis yang terjadi pada tikus putih tersebut disebut dengan Adjuvant Induced Arthritis (AIA atau Arthritis adjuvant/AA) berupa kemerahan dan pembengkakan sendi. Jaringan sendi diperiksa setelah periode waktu yang ditentukan sebagai fase aktif, yaitu 3 minggu.

4.3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu :

1. Variabel bebas:

1. Stresor dingin (dimasukkan dalam ruangan 5⁰C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut).
2. Dosis ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) 400 mg/kg BB.
3. Reaktif Oksigen species (ROS).

2. Variabel tergantung:

1. Ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1B) pada sendi.
2. Histopatologi kerusakan sendi.

3. Variabel kendali:

3. Umur, berat badan tikus, jenis kelamin, makanan, kondisi lingkungan.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Model

Hewan model dibagi dalam empat kelompok perlakuan secara acak. Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Lina, dkk., 2003). Hewan model diberi ransumpakan basal

dengan komposisi disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC)(2005) yang mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, vitamin, dan air 12%. Tikus yang digunakan adalah jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan dengan berat 150-200 gram dan berumur 10 minggu. Jumlah keseluruhan yang digunakan 20 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor tikus.

Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya jika pakan tersebut berupa pakan kering dan dapat ditingkatkan sampai 15% dari bobot tubuhnya jika pakan yang dikonsumsi berupa pakan basah. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 ml air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah banyak mengandung air (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 50 x 40 x 20 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari plastik dengan tutup dari rangka kawat. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24⁰C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Prosedur Induksi Arthritis Ajuvan menggunakan CFA

Hewan coba disiapkan, selanjutnya dilakukan injeksi secara intradermal pada pangkal ekor tikus 0,1 ml CFA (*Complete Freund's Adjuvan*). Setelah 14 hari. Setelah 14 hari diberikan booster 0,05 ml CFA secara intradermal pada kaki kanan dan kiri. Setelah 7 hari akan timbul gejala arthritis ajuvan, berupa

pembengkakan, kemerahan dan nyeri pada sendi kaki. Model artritis ini disebut dengan Adjuvant-Induced Arthritis (AIA), dan telah pakai secara luas sebagai model dari rematoid arthritis (AR) (Prabowo, 2004).

4.4.3 Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum Bory*)

Ekstrak etanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Proses pembuatan ekstrak etanol dari rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) yaitu sebagai berikut: rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) dibersihkan dan dipotong kecil – kecil dan dikeringkan sampai kandungan airnya mencapai 20-30%. Rumput laut coklat ditimbang sebanyak 116 gram dan diekstrak secara maserasi dengan 1,5 etanol 85%. Maserasi dilakukan selama 2 hari. Ekstrak kemudian disaring konsentrat filtrat dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C (± 2 jam). Ekstrak menjadi pekat dan kemudian dicuci dengan 100 ml cloroform sebanyak 3 kali dan *the upper layer (nun-lipid fraction)*. Fraksi etanol diambil dan dikeringkan dengan gas N₂ menjadi ekstrak dengan berat konstan.

Setelah dibuat ekstrak etanol selanjutnya diuji fotokimia ini untuk menentukan senyawa marker yang ada dalam rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*).

4.4.4 Dosis Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum Bory*)

Dalam penelitian Fauziah (2013) pemberian ekstrak *Sargassum duplicatum Bory* dengan dosis 100 mg/kgBB pada hewan coba artritis dapat menurunkan

kadar IL-1 β sebesar 21,24%. Berdasarkan penelitian tersebut kami menggunakan dosis ekstrak sargassum 400 mg/kgBB. Diharapkan dengan dosis empat kali lebih banyak akan menurunkan kadar IL-1 β lebih besar.

4.4.5 Pengukuran ekspresi IL-1 β dengan uji imunohistokimia

Preparat jaringan sendi sebelum diwarnai harus melalui proses deparafinasi dan rehidrasi. Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol bertingkat 1-2 masing-masing selama 5 menit. Lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut 3 menit, alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, dan 70% selama berurutan selama 3 menit. Selanjutnya jaringan dicuci dengan aquades dan PBS pH 7,4 sebanyak 3x5 menit. Selanjutnya direndam dalam H₂O₂ selama 20 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. *Blocking* dilakukan dengan menggunakan BSA 1% selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Diinkubasi dengan antibodi primer *mouse anti IL-1 β* selama 24 jam pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi dengan antibodi primer dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Selanjutnya ditambah dengan antibodi sekunder *Rabbit anti-mouse IgG* berlabel *biotin* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambah *streptavidin conjugated horseradish peroxidase* (SHARP) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Lalu ditambahkan cromagen *Diaminobenzidine* (DAB) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat dibilas dengan aquades selama 3x5 menit. Dicuci dengan PBS

pH 7,4 selama 3x5 menit. Dilakukan *counterstaining* dengan Mayer's Hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquadest 3x5 menit. Selanjutnya preparat dikering anginkan dan dilakukan mounting menggunakan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass*.

Preparat jaringan sendi hasil pewarnaan imunohistokimia diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 perbesaran lemah (40x) hingga perbesaran kuat (1000x) sebanyak 5 lapang pandang untuk melihat ekspresi IL-1 β . Perhitungan presentase area ekspresi IL-1 β menggunakan gambaran preparat jaringan sendi perbesaran 400x kemudian dianalisa menggunakan imunnoratio.

4.4.6 Pembuatan Preparat Hitopatologi dengan metode HE

1. Pengambilan Sampel (*Sampling*), Fiksasi, dan Pemotongan Organ

Tikus dikorbankan 30 menit setelah perlakuan terakhir dengan cara dislokasi leher, kemudian tikus dibedah dan diambil organ kakinya. Sampel kaki yang telah diambil dilakukan pengelupasan kulit kemudian dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% untuk menghilangkan darah. Setelah itu, direndam dalam larutan PBS dengan pH 7,4. Setelah fiksasi dilakukan, jaringan direndam dalam larutan etanol 70% selama 24 jam.

2. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dilakukan dengan merendam tulang dalam asam nitrat 10% selama 5 hari.

3. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan dalam larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 80% sampai dengan absolut. Lama jaringan dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C.

4. Penjernihan (*Clearing*)

Proses penjernihan *reagen* yang dipergunakan adalah xylol. Jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernih (xylol). Penjernihan dilakukan dalam xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada oven).

5. Infiltrasi Parafin

Proses infiltrasi parafin yaitu jaringan dimasukkan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III (masing-masing 1 jam di dalam oven).

6. Penanaman Jaringan (*Embedding*)

Embedding dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi paraffin cair. Blok paraffin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 μm . Pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

Pewarnaan Hematoksilin – Eosin diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan

menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I, II dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup (Dewi, 2011).

4.5 Analisis Data

Pada penelitian ini untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) digunakan analisis dengan uji Anova. Uji Tukey dilakukan untuk mengetahui perlakuan terbaik yang dihasilkan. Analisis statistik menggunakan software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 16.0 sedangkan Gambaran Histopatologi dianalisis deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

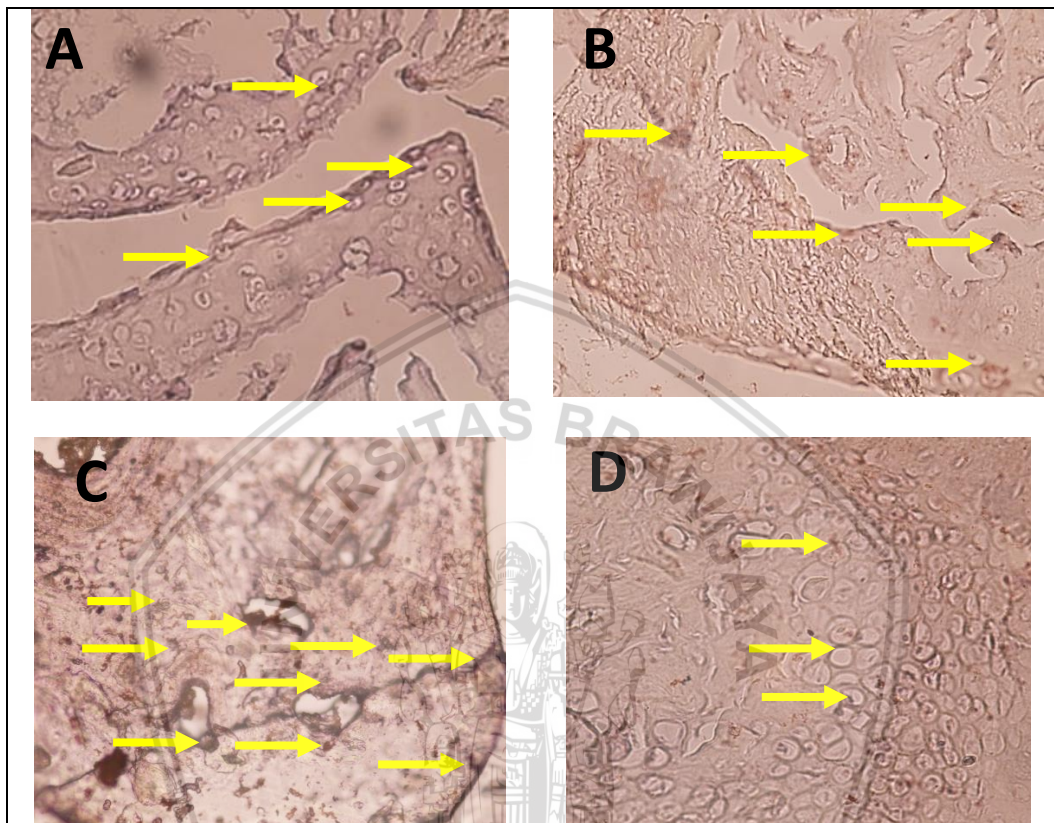
5.1 Ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) pada Sendi Tarsometatarsal Tikus

(*Rattus norvegicus*) *Arthritis Reumatoid*.

Ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) pada sendi tarsometatarsal pada tikus hasil penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 5.1. Ekspresi IL-1 β ditunjukkan dengan tanda panah kuning. Dimana beberapa bagian tampak kecoklatan sebagai indikasi dari keberadaan IL-1 β . Area berwarna kecoklatan muncul disebabkan oleh adanya ikatan antibody IL-1 β dengan antigen IL-1 β pada jaringan. Luas area yang berwarna coklat pada preparat kemudian diukur menggunakan software *immunoratio* dan hasil ditunjukkan dalam persentase area.

Kelompok A merupakan tikus kontrol negatif. Terlihat area kecoklatan pada kelompok A hanya berada di sekitaran tepian kartilago dan sangat jarang. Kelompok A merupakan kelompok yang sangat jarang area kecoklatan apabila dibandingkan dengan tiga kelompok lainnya. Kelompok B merupakan tikus kontrol positif (tikus AR). Terlihat area kecoklatan yang hampir merata dan lebih banyak daripada kelompok A. Sedangkan pada kelompok C (tikus AR + *stressor* dingin). Terlihat lebih banyaknya ditemukan area kecoklatan dibandingkan dengan kelompok B. Hal ini diperkuat dengan penelitian Zautra *et al.*, (2007) *Stressor* merupakan suatu kondisi yang menimbulkan keadaan *stress*, setiap individu yang terpapar dengan *stressor* akan berusaha melakukan adaptasi hingga menuju keadaan homeostasis. *Stressor* yang dipaparkan pada setiap individu akan mempengaruhi imunologi pada tubuhnya, respon ini dapat meningkatkan atau

menurunkan status imunologi. Sehingga IL-1 β mendegradasi kolagen dan proteoglikan lebih banyak dibandingkan dengan AR yang tidak diberi *stressor*



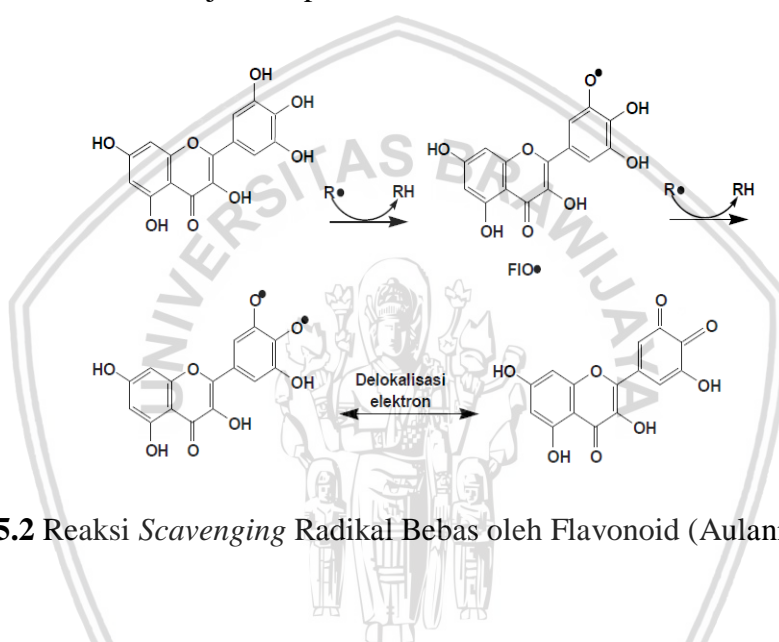
Gambar 5.1 Immunohistokimia Kartilago pada Bagian Sendi Tarsometatarsal Tikus (400X)

Keterangan : (A) merupakan tikus normal (kontrol negatif), ekspresi IL-1 β ditunjukkan dengan warna coklat yang lebih gelap. Kondisi tikus normal; (B) tikus AR (kontrol positif); (C) tikus (AR + *stressor*); (D) tikus (AR + *stressor* + terapi *Sargassum duplicatum Bory* dosis 400 mg/KgBB).

→ : menunjukkkn ekspresi IL-1 β

Kelompok D (tikus AR + *stressor* + *Sargassum duplicatum Bory*) terlihat adanya penurunan jumlah warna kecoklatan dibanding dengan kelompok B dan C. Terapi rumput laut coklat mampu menurunkan ekspresi IL-1 β pada kasus RA. Menurut Aulanni'am (2012) hasil tes fitokimia *Thin Layer Chromatography* (TLC) dan infrared spektrum ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*)

menunjukkan hasil yang positif untuk flavonoid, phlorotanin, dan alkaloid. Tetapi negatif untuk terpenoid yang merupakan zat toksik dari tumbuhan, sehingga rumput laut coklat aman digunakan untuk terapi pengobatan. Aktivitas antioksidan flavonoid dan phlorotanin berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga mampu menurunkan kadar radikal bebas. Reaksi *scavenging* radikal bebas oleh senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Reaksi *Scavenging* Radikal Bebas oleh Flavonoid (Aulanni'am, 2012)

Tabel 5.1 Persentase Area Hasil Analisis ImmunoRatio dari Preparat Immunohistokimia IL-1 β

Kelompok Perlakuan	Ekspresi IL-1 β	Peningkatan	Penurunan
		Ekspresi IL-1 β (%)	Ekspresi IL-1 β (%)
A (Kontrol Negatif)	28,58 \pm 0,056 ^a	-	-
B (AR)	76,66 \pm 0,049 ^c	168,22	-
C (AR + <i>Stressor</i>)	84,16 \pm 0,026 ^d	194,47	-
D (AR + <i>Stressor</i> + <i>Sargassum</i>)	54,38 \pm 0,009 ^b	-	35,38

Keterangan : Notasi menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P<0,05)

Menunjuk pada Tabel 5.1, menunjukkan adanya peningkatan IL-1 β secara signifikan (P<0,05). Hasil analisa statistik dengan *One Way* ANOVA dan dilanjutkan dengan BNJ. Kelompok A berbeda nyata dengan kelompok B, terjadi

peningkatan ekspresi IL-1 β yang signifikan pada kelompok B hal ini dikarenakan induksi CFA menyebabkan munculnya respon inflamasi yang diinduksi oleh IL-1 β . Kelompok C berbeda nyata dengan kelompok A dan berbeda nyata dengan kelompok B, terjadi peningkatan ekspresi IL-1 β yang signifikan pada kelompok C, Pemberian stresor dingin menyebabkan peningkatan proses peradangan yang digambarkan oleh parameter IL-1 beta. Kelompok D dengan terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dosis 400 mg/kg BB berbeda nyata dengan kelompok C. Dari data tersebut menunjukkan adanya penurunan ekspresi IL-1 β pada tikus AR yang terpapar *stressor* dingin dengan terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dosis 400 mg/kg BB. Namun dengan dosis terapi 400 mg/kg BB belum mampu menyembuhkan penyakit AR, maka diperlukan adanya variasi dosis yang lebih lanjut.

Kelompok A (Kontrol Negatif) menunjukkan nilai rata-rata ekspresi IL-1 β sebesar $28,58 \pm 0,0561$. Nilai ekspresi IL-1 β pada kelompok A digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Perhitungan uji statistik secara lengkap dapat dilihat pada (Lampiran 6.1). Kelompok tikus perlakuan B (AR) memiliki nilai rata-rata ekspresi IL-1 β sebesar $76,66 \pm 0,04$, sedangkan perlakuan C (AR + *Stressor*) memiliki nilai rata-rata ekspresi IL-1 β tertinggi yaitu sebesar $84,16 \pm 0,02$, dan perlakuan D (AR + *Stressor* + *Sargassum*) memiliki nilai rata-rata ekspresi IL-1 β sebesar $52,38 \pm 0,01$. Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) (Lampiran 6.1) menggunakan SPSS 16.0 for Windows. Pada kelompok perlakuan B memiliki peningkatan ekspresi IL-1 β sebesar 168,22%, Pada kelompok C memiliki peningkatan ekspresi IL-1 β sebesar

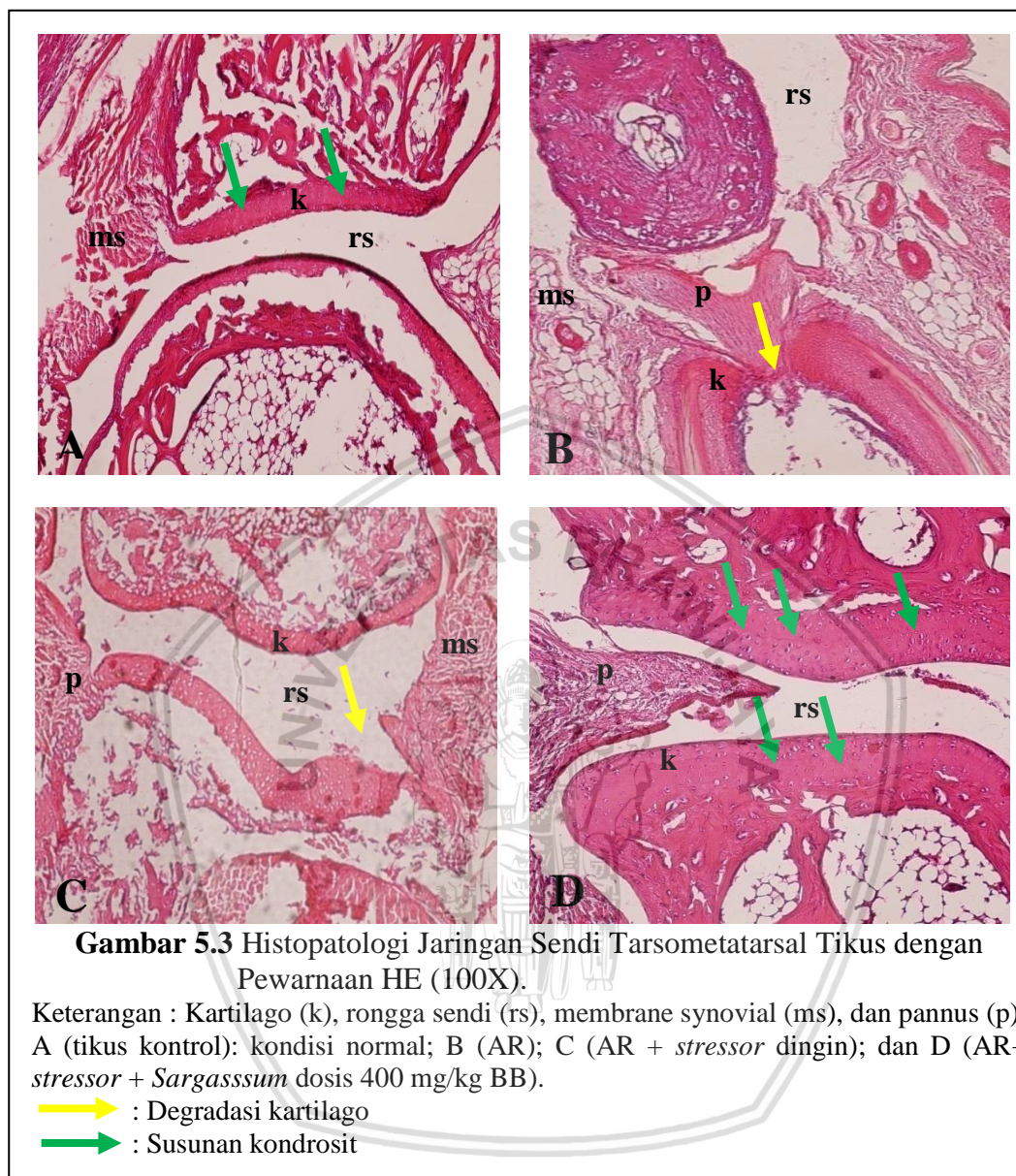
194,47%, sedangkan pada kelompok D mengalami penurunan ekspresi sebesar 35,38%. Hal ini menunjukkan ada pengaruh pemberian CFA, *stressor* dan terapi *Sargassum duplicatum* Bory terhadap nilai ekspresi IL-1 β .

Menurut Lowell and Spiegelman (2000), paparan suhu dingin akan terdeteksi oleh otak kemudian akan mengaktifasi jaras eferen untuk mengantarkan informasi paparan suhu dingin tersebut dari saraf pusat ke saraf tepi. Paparan suhu dingin menyebabkan hipotalamus bekerja untuk mengatur panas dalam tubuh dengan mengaktifkan *Uncoupling Protein* (UCP). *Uncoupling Protein* (UCP) yaitu protein yang berperan dalam suhu dingin yang menyebabkan terjadinya mekanisme termogenesis. Termogenesis akan meningkatkan siklus fosforilasi oksidatif (proses pembentukan energi) pada mitokondria. Mitokondria merupakan organ seluler tempat dihasilkannya energi, salah satunya berupa *Adenosin Trifosfat* (ATP). Mitokondria berperan dalam proses termogenesis. Selain menghasilkan energi, mitokondria juga penghasil utama salah satu bentuk radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS). Adanya interaksi antara elektron yang tidak berpasangan dengan oksigen (O²), menghasilkan radikal superoksida yang merupakan salah satu ROS yang sangat reaktif dan bereaksi dengan DNA, protein, dan lipid dengan cepat sehingga menimbulkan kerusakan oksidatif (Robbins and Zhao, 2011). Adanya peningkatan produksi ROS pada tikus P3 menimbulkan kerusakan oksidatif sehingga mengakibatkan proses peradangan atau inflamasi AR semakin parah dan mengakibatkan kadar IL-1 β yang dihasilkan semakin tinggi.

Degradasi kartilago berkaitan erat dengan meningkatnya aktivitas IL-1 β . Terdapat hubungan yang kuat antara tingkat kerusakan sendi dan peningkatan IL-1 β pada pasien AR. (Aulanni'am *et al.*, 2012). IL-1 β merupakan stimulator yang kuat untuk sel mesenkhim, seperti fibroblas sinovial dan khondrosit untuk menghasilkan matriks metaloproteinase, terutama stromelysin dan kolagenase. IL-1 β juga menghambat produksi inhibitor jaringan metaloproteinase (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) yang dihasilkan oleh fibroblas sinovial, dan aktivitas ini akan menyebabkan kerusakan sendi. Induksi IL-1 β merangsang perkembangan osteoklas yang bertanggung jawab untuk degradasi tulang. Menurut Nijdvelt (2001) mekanisme kerja flurotanin dalam menurunkan jumlah IL-1 β yaitu melalui gugus -OH flurotanin dengan ATP dari enzim kinase yang berikatan akan menghambat IL-1 β sehingga mengakibatkan penurunan ekspresi IL-1 β pada kartilago.

5.2. Terapi Ekstrak Ethanol Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Arthritis terhadap Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi

Gambaran histopatologi sendi tarsometatarsal yang diinduksi CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan setelah diterapi dengan ekstrak ethanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dosis 400 mg/kgBB diamati menggunakan teknik pewarnaan hematoxylin eosin (HE) dapat dilihat pada (Gambar 5.3)



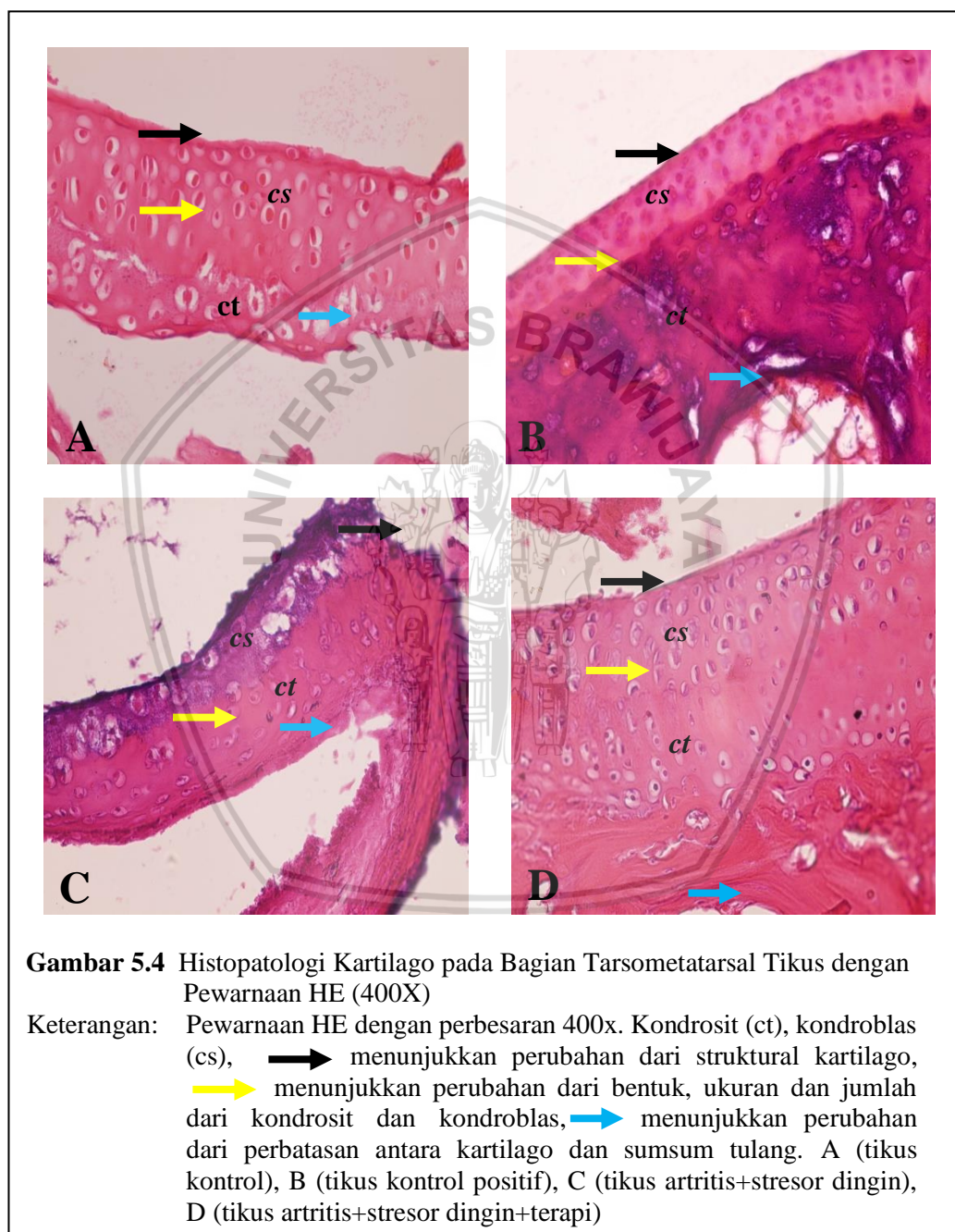
Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) memperlihatkan perubahan struktur pada jaringan sendi tikus yang dapat dilihat pada gambaran histopatologi meliputi dilatasi rongga sendi, inflamasi membran sinovial, perubahan kartilago, dan perubahan matriks pannus. Hal ini sesuai dengan Wiralis & Endang (2009) menyatakan bahwa injeksi CFA tersebut ditandai dengan adanya pembengkakan pada sendi dan secara histopatologi terlihat adanya infiltrasi sel-sel inflamasi pada

jaringan sendi. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Nealson (2002) yang menyatakan bahwa pemberian CFA pada tikus menyebabkan inflamasi sendi, infiltrasi sel inflamasi, kerusakan kartilago dan destruksi tulang. Gambaran histologi pada tikus yang diinjeksi CFA yaitu proliferasi membran sionovial, infiltrasi sel mononuklear, edema, destruksi kartilago dan pannus.

Gambaran histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxyline eosin* pada tikus normal Gambar 5.3 (A) memperlihatkan bentuk normal membran synovial dimana membran sinovial normal merupakan lapisan tipis sel-sel sinovial yang mendasari jaringan ikat longgar, bentuk kartilago yang normal dengan matriks yang teratur dan rongga sendi yang simetris. Tikus AR Gambar 5.3 (B) menunjukkan perubahan bentuk membran sinovial dan berproliferasi ke rongga sendi, destruksi kartilago yang ditunjukkan dengan erosi dan dilatasi rongga sendi yang menunjukkan terjadinya edema. Menurut Gemeinehardt (2012) menyatakan bahwa jaringan yang mengalami edema terlihat sebagai ruangan yang meluas (dilatasi) dan terisi cairan, adanya infiltrasi sel leukosit dan sel-sel inflamasi berupa sel-sel mononuklear dan neutrofil.

Tikus AR dengan perlakuan paparan *stressor* dingin Gambar 5.3 (C) menunjukkan bentuk membran synovial yang tidak teratur (semakin hancur), adanya dilatasi rongga sendi yang menunjukkan edema berupa peningkatan infiltrasi sel-sel leukosit dibandingkan dengan rongga sendi kelompok tikus B. Tikus AR + *stressor* + *sargassum* dengan dosis terapi 400 mg/Kg BB Gambar 5.3 (D) memperlihatkan perbaikan gambaran histopatologi jaringan sendi yang ditunjukkan dengan bentuk membran sinovial dan terbentuk keteraturan matriks pannus, perbaikan bentuk

kartilago yang ditunjukkan dengan susunan sel kondrositnya mengalami keteraturan lapisan kartilago pada bagian superfisial, dimana kondisi bentuk dan ukuran sel kondrosit yang mengalami hipertrofi mendekati kelompok A.



Gambar 5.4 (A) merupakan gambar histopatologi jaringan sendi normal pada tikus putih (*Rattus novvergicus*), terlihat sel kartilago yang terdiri dari kondrosit

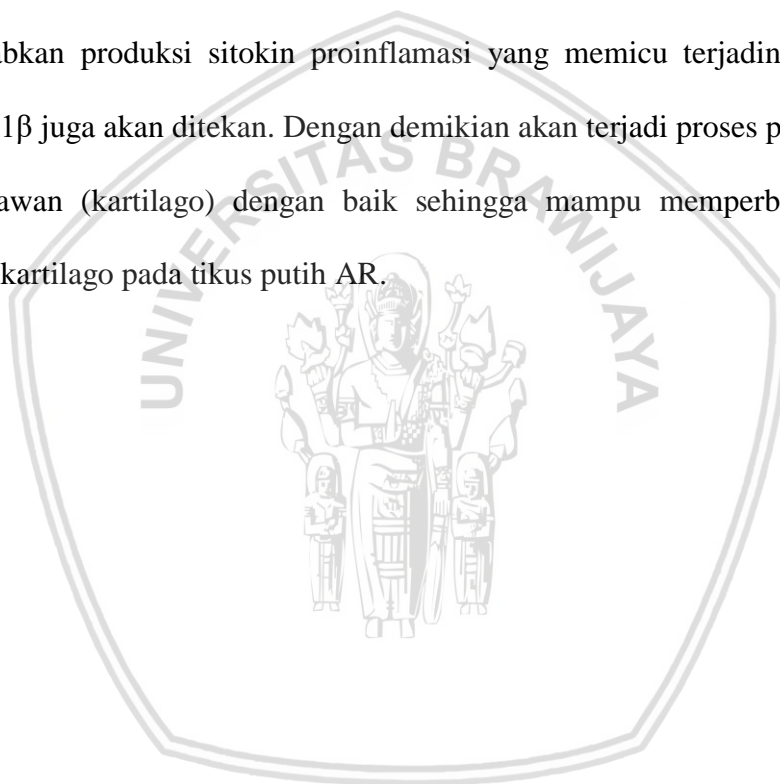
dan kondroblas dalam kondisi normal. Salah satu fungsi kartilago yaitu untuk menunjang jaringan lunak. Karena permukaannya licin dan berdaya kenyal, maka kartilago merupakan daerah peredam guncangan dan permukaan gesekan bagi sendi. Menurut Lipsky (2006), kondroblas adalah sel bakal yang berbentuk oval terletak di pinggir dari kartilago. Sedangkan kondrosit mempunyai inti yang khas berbentuk bundar dengan sebuah inti. Kondrosit terletak di dalam *lacuna* (celah) berbentuk bulat. Kondrosit disebut juga sel kartilago, apabila berkelompok disebut sel isogen. Letak kondrosit di dalam jaringan tulang rawan lebih ke dalam daripada letak kondroblas.

Gambar 5.4 (B) merupakan gambaran histopatologi jaringan sendi tikus kelompok AR yang diinduksi dengan CFA. Kerusakan yang terjadi pada Gambar 5.4 (B) memperlihatkan adanya degradasi dari sendi tikus yang ditandai dengan adanya erosi dan dilatasi rongga sendi. Selain itu juga terdapat destruksi sel kondrosit berupa hipertropi kondrosit serta struktural kartilago sudah mulai tidak beraturan yang diakibatkan karena adanya pengaruh CFA yang diinduksikan pada tikus untuk membuat menjadi kondisi AR. CFA menyebabkan adanya respon inflamasi dan menyebabkan sistem imun terganggu dengan mengaktifkan limfosit T sebagai respon *heat shock proterin* karena terjadi stres lingkungan akibat dari induksi CFA sehingga dapat merusak sel dan jaringan dan menyebabkan destruksi struktural dari jaringan sendi. Inflamasi akibat induksi CFA mengakibatkan pelebaran pembuluh darah vaskuler diikuti makrofag dan sitokin menuju jaringan atau sel yang terinfeksi melalui sel endotel sehingga dapat menyebabkan hipertropi (Holm, 2000).

Kerusakan jaringan sendi pada kelompok (AR + *stressor*) Gambar 5.4 (C) terlihat adanya proliferasi kondrosit yang juga mengalami hipertropi ukuran sel dibandingkan Gambar 5.4 (B) serta kartilago berdifusi secara bebas ke dalam rongga sendi. Proliferasi kondrosit tersebut dikarenakan kegagalan sel untuk mengalami apoptosis fisiologis. Menurut Lowell and Spiegelman (2000), pemberian paparan stresor dingin mengakibatkan adanya produksi ROS yang dapat meningkatkan inflamasi atau radang dari suatu penyakit. Peningkatan produksi ROS berasal dari fosforilasi oksidatif pada mitokondria tikus, sehingga menyebabkan peningkatan IL-1 β pada jaringan sendi *metatarsophalangeal* diikuti dengan kerusakan oksidatif. ROS menyebabkan proses peradangan atau inflamasi AR semakin parah pada artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.

Gambar 5.4 (D) merupakan gambaran histopatologi dari tikus kelompok D (AR + *stressor* + *sargassum* dosis terapi 400 mg/kg BB), terlihat perbaikan struktural maupun susunan kartilago yang teratur serta jumlah dan ukuran sel kondrosit dan kondroblas sudah mulai berkurang yang mendekati kelompok tikus normal (Gambar 5.3 P1). Pemberian. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Mirshafiey & Mohsenzadegan, 2008) stress oksidatif pada kasus AR telah digambarkan sebagai mekanisme penting yang mendasari terjadinya kerusakan sinovitis proliferaatif. IL-1 β berlebihan sebagai poros penting dalam patogenesis AR diperkirakan menjadi penyebab utama dalam pelepasan ROS pada kasus AR. Kerusakan endotel ROS meningkatkan permeabilitas mikrovaskular dan perubahan neutrofil menjadi peradangan. Oleh karena itu, antioksidan bisa menjadi pilihan tepat untuk penelitian di bidang pengobatan kasus AR.

Menurut Nijdveld (2001) mekanisme kerja flurotanin dalam menurunkan jumlah IL-1 β yaitu melalui gugus –OH flurotanin dengan ATP dari enzim kinase yang berikatan akan menghambat IL-1 β sehingga mengakibatkan penurunan ekspresi IL-1 β pada kartilago. Sedangkan menurut De-jian-jian (2004) akibat pemberian ekstrak ethanol rumput laut coklat mampu menekan kembali sel mesenkim, sehingga sel mesenkim dapat mengelompok kembali. Hal ini menyebabkan produksi sitokin proinflamasi yang memicu terjadinya inflamasi yaitu IL-1 β juga akan ditekan. Dengan demikian akan terjadi proses penyembuhan tulang rawan (kartilago) dengan baik sehingga mampu memperbaiki struktur jaringan kartilago pada tikus putih AR.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi ekstrak ethanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) dengan dosis 400 mg/kg BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) model AR yang terpapar *stressor* dingin menurunkan ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) sebesar 35,38%.
2. Pemberian terapi ekstrak ethanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) dengan dosis 400 mg/kg BB mampu memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi tarsometatarsal.

6.2. Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan terhadap efektifitas dan variasi dosis pemberian terapi ekstrak ethanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*).
2. Diperlukan konfirmasi lanjutan terhadap uji toksisitas pemberian ekstrak ethanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anggadiredja, J. T., Heri, P., and Sri, I. 2006. Rumpul Laut. Panebar Swadaya. Jakarta.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal diversity web. University Of Michigan Of Zoology
- Aslan, L. M. 1991. Budidaya Rumpul Laut. Kanisius, Yogyakarta.
- Aulanni'am, A. Roosdiana, dan N.L. Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences*, Vol. 6, pp. 144-154.
- Bendele A. M. 2001. Animals Models of Rematoid Arthritis. *Journal Musculoskel Neuron Interact* 1(4):377-385
- Brunner and Suddarth. 2002. Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah, Edisi 8. Jakarta: EGC
- Bratawijaya, K.G. 2004. *Imunologi Dasar: Autoimunitas*. 6 th Jakarta: Gaya baru: p.218
- Crofford, L.J. and L. Ronald. 2000. *Arthritis And Autoimmunity In Animals*. 566-583
- De-jian-jian. 2004. Pharmacological Effect of *Tanin* Drug. *Journal Kedokteran Hewan* 8(4): 257-263.
- Fletcher D.S, W.R. Widmer, S. Luells, A Christen, C Orevillo and S Shah. 2007. *Theraupeutic Administration Of A Selective Inhibitor Of Nitric Oxide Synthase Does Not Ameliorate The Cronic Inflammation And Tissue Damage Associated With Adjuvant Induced Arthritis In Rat. N Jersey: J Pharm Med Chem*.
- Gary, F. S. 2003. Evolving Concepts in Rheumatoid Arthritis. *Nature* 423 (6937): 356-61.
- Gemeinhardt. 2012. Near Infrared Fluorescence Imaging of Experimentally Complement Induced Arthritis in Rats Using the Comparison Magnetic Resonance Imaging, Histology, and Clinical Score. *Journal Biomed. Opt.* 17(10): 106008.
- Guyton AC, and Hall JE. 2011. Textbook of medical physiology. Twelfth Edition, Philadelphia : WB Saunders Company, pp 867-875.
- Holm, B, L. Svelander, J.C. Lorentzen, and A. Buchtt. 2000. Pathogenetic Studies Adjuvant Induced Arthritis. *Scand Journal Immunology* 54:599-605.
- Husney, A., R.M., Crichlow, and M. Shoors. 2004. What Happens to the Joint in Rheumatoid Arthritis. *Journal Rheumathology*.

- Janero, D.R. 2001. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid Activity as Diagnosis Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissues Injury. *Free Radical Biology & Medicine* 9: 515-40.
- Lipsky, P.E. 2006. Rheumatoid Arthritis. Dalam: Fauci, A.S.(eds). *Harrison's Rheumatology*, USA: McGraw-Hill, 85-105.
- Miller, S.D, J.C., Russel, H.E., MacInes, J., Abdelkrim, and R.M., Fewster. 2010. Multiple Paternity in Wild Population of Invasive Rattus Species. *New Zeland Journal of Ecology* 34 (3): 360-362.
- Mirsyafie, A. and A. M. Mohsenzadegan. 2008. *The rol of reactive oxygen spesies Ni immunopathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Iran Journal Allergy Asthma Immunology*, December; 7(4): 195-202
- Mitchell, P., and Moyle, J. 1967. Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation. *Nature* 213 (5072): 137-9.
- Prabowo, S. 2004. Pengaruh Stresor Dingin terhadap Proses Keradangan pada Arthritis Ajuvan: Penelitian Eksperimental pada Arthritis Ajuvan (Model Hewan Untuk Arthritis Rematoid) [Disertasi]. UNAIR.
- Rahmat, A. 2006. Vitamin C dan Artritis. Ruler and reseach Program. *Afr Journal of Food Agr Nutrition and Develompment* 6(2).
- Ronaghy, A., Prakken, B.J., Takabayashi, K., Firestein, G.S., Boyle, D., Zvailfer, N.J., Roord, S.T.A, Albani, S., Carson, D.A., and Raz, E. 2002. Immunostimulatory DNA Sequences Influence the Course of Adjuvan Arthritis. *Journal Immunology* 168: 51-56.
- Samee, H., Zhen-xing, Li, Hong, Lin, Jamil, K., and Yong-chao, Guo. 2009. Anti-Allergic Effects of Etanol Extract from Brown Seaweeds. *Journal of Zheijiang University Science B*. 10 (2): 147-153.
- Setiawan, A. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Buah Kesemek (*Diospyros Kaki L.F.*) terhadap Kadar Interleukin 8 (IL8) dan Gambaran Histopatologi terhadap Jaringan Sendi Tikus (*Rattus Novergicus*) Arthritis. [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Suryana BPP. 2008. *Keseimbangan Sitokin Pro Inflamasi Dan Anti Inflamasi Pada Destruksi Sendi Rheumatoid*. Kumpulan makalah temu ilmiah reumatologi. Jakarta:1-4.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Kanisius, Yogyakarta; 50-55.
- Yuliasih. 2009. *Imunopatogenesis Arthritis Rheumatoid*. Dalam: *Kumpulan Makalah temu Ilmiah Reumatologi*. Jakarta:32-44
- Zahra, R., Vahabzadeh, F., and Sartavi, K. 2007. Antioxidant Activity of Extract from Brown Alga, *Sargassum boveanum*. *African Journal. of Biotechnology*. 6 (24): 2740- 2745.